

тить, что в этом отношении плазмида рMT2 имеет некоторое сходство с плазмидой рPS10, стабилизация которой в клетках гетерологичных хозяев также связана с системой инициации репликации и обусловлена мутациями в LZ-последовательность Rep-белка, приводящими к снижению репрессии промотора гер-гена и тем самым обеспечивающими увеличение концентрации белка инициации в бактериальной клетке [4].

Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования Республики Беларусь (тема 974).

1. Benson S., Shapiro J. // J. Bacteriol. 1978. Vol. 135. P. 278.
2. Титок М.А., Максимова Н.П., Фомичев Ю. К. // Молекул, генетика, микробиология и вирусология. 1991. № 9. С. 9.
3. Murata T., Ohnishi M., Ara T. et al. // J. Bacteriol. 2002. Vol. 184. P. 3194.
4. Fernandez-Tresguerres M.E., Martin M., Garcia de Viedma D. et al. // J. Bacteriol. 1995. Vol. 177. P. 4377.
5. Титок М.А. // Генетика. 2003. Т. 39. С. 1606.
6. Woodcock D.M., Crowther P.J., Doherty J. et al. // Nucl. Acids Res. 1989. Vol. 17. P. 3469.
7. Franklin F.C., Bagdasarian M., Bagdasarian M. M. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1981. Vol. 78. P. 7458.
8. Желдакова Р.А., Максимова Н.П., Кульба А. М. и др. // Молекул, генетика, микробиология и вирусология. 1985. № 1. С. 26.
9. Титок М.А., Олехнович И.Н., Евтушенков А. Н. // Там же. 1991. № 3. С. 18.
10. Yanisch-Perron C., Vierira J., Messing J. // Gene. 1985. Vol. 33. P. 103.
11. Jagura-Burdzy G., Kostelidou K., Pole J. et al. // J. Bacteriol. 1999. Vol. 181. P. 2807.
12. El-Robb M.S., Busby S.J. W. // Biochem. J. 2002. Vol. 368. P. 835.
13. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М., 1976.
14. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York, 1989.
15. Devereux J., Haeblerli P., Smithies O. // Nucl. Acids Res. 1984. Vol. 12. P. 387.
16. Zukowski M.M., Gaffney D.F., Speck D. et al. // Proc Natl Acad Sci. 1983. Vol. 80. P. 1101.
17. Greated A., Titok M.A., Krasowiak R. et al. // Microbiol. 2000. Vol. 146. P. 2249.
18. Tian Q.B., Ohnishi M., Tabuchi A. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996. Vol. 220. P. 280.
19. Okawa N., Tsuchiya H., Mori K. et al. // J. Bacteriol. 1991. Vol. 173. P. 2600.

Поступила в редакцию 10.12.2004.

Марина Алексеевна Титок - кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики.

УДК 579.8.841.11:252.5

М.А. ТИТОК

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ НЕСОВМЕСТИМОСТИ ПЛАЗМИДЫ рMT2 (IncP-9)

We have determined the location of determinants responsible for incompatibility function of the рMT2 plasmid of the P-9 incompatibility group. It appears that incompatibility is due to the *rep* gene and the promoter region of the *par* operon. These results provide the basis for directed selection of multicopy variants of the рMT2 plasmid that could be used for the construction of broad host range vectors for molecular cloning.

Внехромосомные генетические элементы, имеющие сходные (или идентичные) системы инициации репликации (гер-области), а также локусы, ответственные за распределение плазмидных копий в процессе деления клетки (пар-области), не способны вместе наследоваться одной бактериальной клеткой [1, 2]. Данное свойство - главный критерий классификации плазмид. Основной таксономической единицей является группа несовместимости, объединяющая сходные плазмидные репликоны [3].

Плазмиды рMT2, являясь мини-репликоном, обладает основными свойствами, присущими исходной плазмиде рM3 группы несовместимости Р-9. В частности, она способна поддерживать в клетках различных грамотрицательных микроорганизмов, характеризуется нестабильностью наследования при температуре 37 °С в бактериях семейства *Enterobacteriaceae* и несовместима с исходным репликоном рM3 [4]. Наличие полного сиквенса плазмиды рMT2 [5] создает необходимые предпосылки для детального изучения систем репликации и

стабильного поддержания данного внехромосомного генетического элемента группы несовместимости P-9.

Целью настоящей работы являлось картирование генетических локусов, ответственных за функцию несовместимости плазмиды pMT2 группы IncP-9.

Материал и методика

В работе использовались бактерии *E. coli* K DH5a (F-φ80, *dlacZ*, Δ*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* (*r_k*, *m_k*), *supE44*, *relA1*, *deoRΔ* (*lacZYA-argF*) U169 [6]), а также плазмиды, характеристика которых представлена в табл. 1.

Таблица 1

Характеристика плазмид, использованных в работе		
Плазмида	Характеристика	Источник
pMT2	Km ^R , мини-репликон плазмиды pM3	[4]
pMT2R	Km ^R терморезистентный вариант плазмиды pMT2	[7]
pUC18	Am ^R , ColE1 репликон	[8]
pGEMT-T	Ap ^R , ColE1 репликон	Promega (США)
pAG1	Ap ^R . В плазмиду pUC18 клонирован PstI-фрагмент плазмиды pMT2 размером 1357 п. н., содержащий <i>rep</i> -ген, <i>oriV</i> и часть <i>orf1</i> .	Получена в данной работе
pAG2	Ap ^R . В плазмиду pUC18 клонирован PstI-фрагмент плазмиды pMT2 размером 2278 п. н., содержащий <i>res</i> -, <i>tolA</i> -, <i>korA</i> - и частично <i>parB</i> -ген	То же
pAG3	Ap ^R . В плазмиду pUC18 клонирован PstI-фрагмент плазмиды pMT2 размером 835 п. н., содержащий частично <i>parB</i> - и <i>parA</i> -ген	-/-
pAG4	Ap ^R . В плазмиду pUC18 клонирован PstI-фрагмент плазмиды pMT2 размером 2826 п. н., содержащий промоторные области <i>par</i> - и <i>mpf</i> -оперона, а также <i>orf8</i> , <i>orf9</i> и частично <i>orf10</i>	-/-
pAG5	Ap ^R . В плазмиду pUC18 клонирован PstI-фрагмент плазмиды pMT2 размером 1240 п. н., содержащий частично <i>orf10</i> , Km ^R -ген и частично <i>orf1</i>	-/-
pAG4.1	Ap ^R . В плазмиду pUC18 клонирован BamHI-PstI-фрагмент плазмиды pAG4 размером 903 п. н., содержащий промоторную область <i>par</i> -оперона плазмиды pMT2	-/-
pAG1.1	Ap ^R . В плазмиду pUC18 клонирован EcoRI-PstI-фрагмент плазмиды pAG1 размером 905 п. н., содержащий <i>rep</i> -ген и <i>oriV</i> плазмиды pMT2	-/-
pAG1.1Δ <i>rep</i>	Ap ^R . BamHI-делеция в плазмиде pAG1.1 размером 223 п. н., приводящая к инактивации <i>rep</i> -гена плазмиды pMT2	-/-
pGMT1	Ap ^R . В состав вектора pGEMT клонирован продукт амплификации промоторной области <i>par</i> -оперона плазмиды pMT2, полученный с помощью праймеров F1-R1	-/-
pGMT2	Ap ^R . В состав вектора pGEMT клонирован продукт амплификации промоторной области <i>par</i> -оперона плазмиды pMT2, полученный с помощью праймеров F2-R1	-/-
pGMT3	Ap ^R . В состав вектора pGEMT клонирован продукт амплификации промоторной области <i>par</i> -оперона плазмиды pMT2, полученный с помощью праймеров F1-R2	-/-
pGMT4	Ap ^R . В состав вектора pGEMT клонирован продукт амплификации промоторной области <i>par</i> -оперона плазмиды pMT2, полученный с помощью праймеров F2-R3	-/-
pGMT5	Ap ^R . В состав вектора pGEMT клонирован продукт амплификации промоторной области <i>par</i> -оперона плазмиды pMT2, полученный с помощью праймеров F3-R1	-/-
pGMT6	Ap ^R . В состав вектора pGEMT клонирован продукт амплификации промоторной области <i>par</i> -оперона плазмиды pMT2, полученный с помощью праймеров F4-R1	-/-
pGMT7	Ap ^R . В состав вектора pGEMT клонирован продукт амплификации промоторной области <i>par</i> -оперона плазмиды pMT2, полученный с помощью праймеров F4-R3	-/-
pGMT8	Ap ^R . В состав вектора pGEMT клонирован продукт амплификации промоторной области <i>par</i> -оперона плазмиды pMT2, полученный с помощью праймеров F2-R5	-/-
pGMT9	Ap ^R . В состав вектора pGEMT клонирован продукт амплификации промоторной области <i>par</i> -оперона плазмиды pMT2, полученный с помощью праймеров F5-R4	-/-
pGMT10	Ap ^R . В состав вектора pGEMT клонирован продукт амплификации промоторной области <i>par</i> -оперона плазмиды pMT2, полученный с помощью праймеров F7-R3	-/-
pGMT11	Ap ^R . В состав вектора pGEMT клонирован продукт амплификации промоторной области <i>par</i> -оперона плазмиды pMT2, полученный с помощью праймеров F2-R6	-/-

Бактерии выращивали в LB-бульоне и на LB-агаре [9]. Применялись коммерческие препараты антибиотиков ампициллина (Ap) и канамицин сульфата (Km) в конечной концентрации 100 мкг/мл и 25 мкг/мл соответственно.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Характеристика использованных в работе праймеров представлена в табл. 2. Для проведения ПЦР применяли Kit Bio-X PCR System (Biolabs, Англия). Реакционная смесь (50 мкл) содержала 1 ед. полимеразы, 200 мкМ каждого праймера, 200 мкМ дНТФ, 1,5 мМ MgCl₂, 3 % глицерина и буфер согласно протоколу фирмы-изготовителя. Режимы амплификации: 94 °С - 5 мин (1 цикл); 94 °С - 30 с, 54 °С - 30 с, 68 °С - 1 мин (для фрагментов размером 356-902 п. н.) либо 68 °С - 30 с (для фрагментов размером 76-196 п. н.) (30 циклов); 68 °С - 5 мин (1 цикл). Продукты амплификации клонировали в pGEM-T Easy-вектор.

Таблица 2

Характеристика использованных в работе праймеров			
Координаты амплифицируемой последовательности pMT2	Праймеры	Последовательность праймеров	Размер ПЦР продукта (п. н.)
6623-7526	F1 R1	5'-GGT TCG GTG GGG TGT C-3' 5'-CAT CAC ATT CGG CGA CG-3'	902
6996-7526	F2 R1	5'-CAT GGT GAC CTT CCT ATG-3' 5'-CAT CAC ATT CGG CGA CG-3'	530
6623-6996	F1 R2	5'-GGT TCG GTG GGG TGT C-3' 5'-AAA CGC ACA GCC GTT GC-3'	373
6996-7366	F2 R3	5'-CAT GGT GAC CTT CCT ATG-3' 5'-AGA CAC CTC GCG CAA ATG-3'	370
7366-7526	F3 R1	5'-CAA CCA CGA AAC ACC TTG-3' 5'-CAT CAC ATT CGG CGA CG-3'	160
7170-7526	F4 R1	5'-AAG GGA CTT GCT ACA CTG-3' 5'-CAT CAC ATT CGG CGA CG-3'	356
7170-7366	F4 R3	5'-AAG GGA CTT GCT ACA CTG-3' 5'-AGA CAC CTC GCG CAA ATG-3'	196
6996-7072	F2 R5	5'-CAT GGT GAC CTT CCT ATG-3' 5'-TGA GGG GTT TAC TGA TGC-3'	76
7072-7188	F5 R4	5'-GTC AAC CCC TAA ATA GGG-3' 5'-CAG TGT AGC AAG TCC CTT-3'	116
7226-7366	F7 R3	5'-GCG TAC AGA TTC TGT TGG-3' 5'-AGA CAC CTC GCG CAA ATG-3'	140
6996-7130	F2 R6	5'-CAT GGT GAC CTT CCT ATG-3' 5'-GAC CGT ATC AAT TTC CCG-3'	134

Манипуляции с плазмидами. Плазмидную ДНК выделяли с помощью Kit Wizard® plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, ClilA).

Фрагменты рестрикции и продукты амплификации вырезали из агарозного геля и чистили Kit GeneClean Spin (Bio101, США).

Трансформацию бактерий *E.coli* проводили согласно методическим рекомендациям, изложенным в руководстве [9].

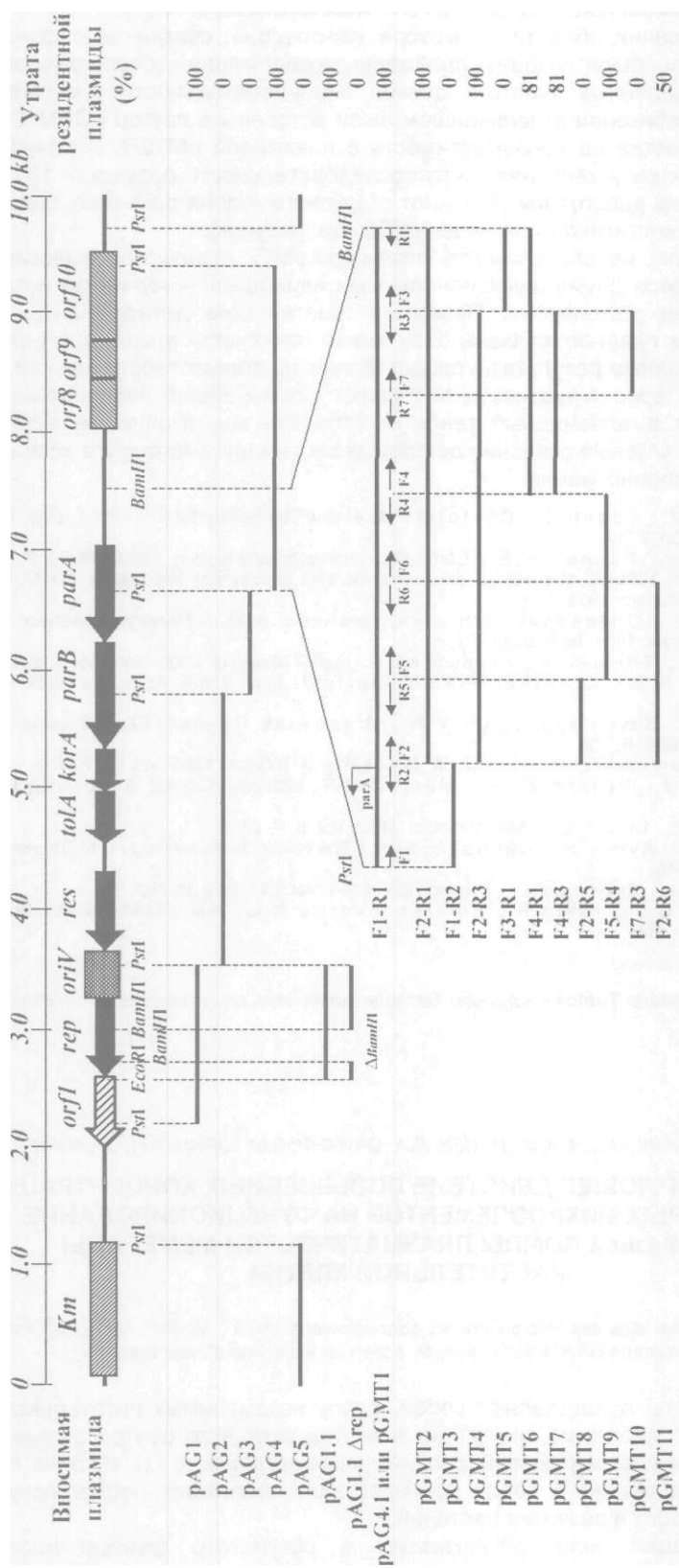
Рестрикция плазмидной ДНК и последующее лигирование фрагментов соответствовали рекомендациям фирм-изготовителей Boehringer Mannheim (Германия), Biolabs (Англия) и Fermentas (Литва). В качестве реперной ДНК при определении размеров рестрикционных фрагментов использовали 1 kb репер (Bio-labs, Англия).

Тест на несовместимость. Плазмиды, содержащие отдельные функциональные единицы плазмиды pMT2, вносили путем трансформации в бактерии, содержащие pMT2R или pMT2. Отдельные клоны трансформантов рассевали на среде с ампициллином (маркер, детерминируемый вносимой плазмидой) при температуре 30 °С и после двукратного пассирования проверяли на способность расти в присутствии канамицина (маркер плазмиды pMT2R или pMT2). Частоту элиминации плазмиды pMT2R (или pMT2) определяли как отношение количества клонов, растущих на канамицине, к общему количеству проверенных клонов. В качестве контроля определяли частоту утраты плазмиды pMT2R (или pMT2) в присутствии исходной плазмиды pUC18 или pGEM-T, а также в отсутствие какого-либо селективного давления при тех же условиях культивирования.

Результаты и их обсуждение

Функция несовместимости является основной классификационной характеристикой любого внехромосомного генетического элемента [3]. Как правило, генетические детерминанты, определяющие данное свойство, локализованы в области инициации репликации [1] и связаны с генетической системой, обеспечивающей распределение вновь образующихся копий плазмидной ДНК по дочерним клеткам, в частности, с центромероподобной последовательностью [2]. В результате анализа нуклеотидной последовательности плазмиды rMT2 были обнаружены открытые рамки считывания, способные детерминировать белки, имеющие достоверную гомологию, с белками, обеспечивающими инициацию и сегрегацию известных внехромосомных генетических элементов. В частности, гер-ген (координаты 31970-2643) детерминирует белок, проявляющий 44 % гомологии с белком инициации репликации плазмиды широкого круга хозяев pBB1 *Bordetella bronchiseptica* [10]. Однако плазмиды rMT2 (IncP-9) и pBB1 совместимы и стабильно поддерживаются в одной клетке, следовательно, они относятся к различным таксономическим единицам. В области между гер- и res-генами (координаты 3654-3197) выявлен ряд последовательностей, присущих сайту инициации репликации (oriV). Четыре гена *park* (координаты 6995-6230), *parB* (координаты 6217-5273), *korA* (координаты 5276-6217) и *tolA* (координаты 4929-4504), входящие в состав раг-оперона, детерминируют белки, гомологичные белку IncC плазмиды R751 IncP-1 (36 % гомологии), KogB плазмиды RK2 IncP-1 (24 % гомологии), KogA плазмиды R751 IncP-1 (25 % гомологии) и TolA бактерий *P. putida* (30 % гомологии) соответственно [5]. Установленная гомология белковых молекул позволяет предполагать, что обнаруженные генетические детерминанты определяют синтез белков, участвующих в процессе репликации и стабильного поддержания плазмиды rMT2 в бактериальной клетке. Для картирования областей, ответственных за функцию несовместимости плазмиды rMT2, первоначально был проведен функциональный анализ плазмид, в состав которых были клонированы PstI-фрагменты мини-репликона rMT2 (плазмиды rAG1 - rAG5). Тест на несовместимость показал, что плаزمида rMT2 со 100 % частотой элиминируется из клеток при внесении в них плазмид rAG1 и rAG4 и стабильно сохраняется в присутствии плазмид rAG2, rAG3 и rAG5. Полученный результат является вполне закономерным для плазмиды rAG1, поскольку в ее состав входит область инициации репликации плазмиды rMT2, которая, как правило, ответственна за несовместимость с близкородственными репликонами [1]. В то же время установленный факт несовместимости плазмид rMT2 и rAG4 представляется весьма интересным, поскольку в пределы PstI-фрагмента, встроенного в плазмиду rAG4, не входят, за небольшим исключением, детерминанты, известные своей способностью обеспечивать указанное свойство. Известно, что промоторная область раг-оперона у некоторых внехромосомных генетических элементов (в частности, плазмиды R1), являясь центромероподобной последовательностью, детерминирует функцию несовместимости [11], а поскольку данный участок входит в состав плазмиды rAG4, следовательно, его присутствие может обеспечивать функцию несовместимости.

Для более точной локализации областей, ответственных за несовместимость плазмиды rMT2, был осуществлен функциональный анализ плазмид rAG1.1 и rAG4.1 Дгер, а также rAG4.1. Установлена несовместимость плазмид rAG1.1 и rAG4.1 с плазмидой rMT2, тогда как rAG1.1Дгер способна стабильно наследоваться в одной клетке с плазмидой rMT2. Следовательно, несовместимость плазмиды rMT2, скорее всего, связана с последовательностью гер-гена и промоторной областью раг-оперона (рисунок). Следует отметить, что плазмиду rAG1.1Дгер была получена в результате BamHI-делеции в плазмиде rAG1.1. Данная мутация привела к нарушению последовательности гер-гена в участке, непосредственно примыкающем к функциональному домену (HTH-последовательность) [12], ответственному за связывание сайта инициации репликации с молекулой ДНК. Данный факт позволяет предполагать, что неспособность плазмид группы IncP-9 вместе наследоваться одной бактериальной клеткой вытекает из конкуренции близкородственных Rep-белков за взаимодействие с областью



Локализация генетических детерминант несовместимости плазмиды rMT2 IncP-9.

Приведены результаты теста на несовместимость. Слева указаны конструкции, при внесении которых устанавливалась частота элиминации резидентной плазмиды (данные приведены справа). В тесте на несовместимость плазмид rAG1-pAG4 в качестве резидентной использовали rMT2, в остальных случаях – rMT2R.

опV, поскольку именно этот этап является критическим в процессе инициации репликации любого внехромосомного генетического элемента [1].

Для картирования области промотора *rag*-оперона, связанной с функцией несовместимости, были созданы праймеры, позволяющие обеспечить амплификацию определенных участков данной последовательности (см.табл. 2). Продукты амплификации в дальнейшем были встроены в вектор pGEM-T и использованы в тестах на несовместимость с плазмидой pMT2R. В результате этих экспериментов установлено, что последовательность размером 154 п. н., расположенная на расстоянии 76 п. н. от стартового кодона *ragA*-гена, связана с функцией несовместимости плазмиды pMT2 (см. рисунок).

Таким образом, несовместимость плазмиды pMT2 группы несовместимости P-9 обеспечивается двумя функциональными единицами - гер-геном и промоторным участком *rag*-оперона. Поскольку генетические детерминанты несовместимости, как правило, связаны с функцией копияности плазмидного реплика-кона [12], полученные результаты представляют не только теоретический, но и практический интерес, в частности, позволяют в дальнейшем направленно вносить изменения в плазмидный геном и отбирать многокопийные варианты плазмиды pMT2 с целью создания векторных систем широкого круга хозяев для молекулярного клонирования.

- 1.Espinosa M., Cohen S., Couturier M. et al.//The Horizontal Gene Pool/C.M. Thomas (ed.). Amsterdam, 2000. P. 1.
2. Surtees J.A., Funnell B.E.//Curr. topics in development biology. 2003. Vol. 56. P. 145.
3. Datta N. // Plasmid of medical, environmental and commercial importance / K.N. Timmis, A. Puhler (eds.). Amsterdam, 1979. P. 3.
4. Титок М.А., Олехнович И.Н., Евтушенков А.Н. //Молекул, генетика, микробиология и вирусология. 1991. №3. С. 18.
5. Greated A., Titok M.A., Krasowiak R. et al. // Microbiol. 2000. Vol. 146. P. 2249.
6. Woodcock D.M., Crowther P.J., Doherty J. et al.//Nucl. Acids Res. 1989. Vol. 17. P. 3469.
7. Titok M.A., Sevastyanovich Y.R., Krasowiak R. et al. // Plasmid biology, 14-21 septembre. Greece. 2004. P. 153.
8. Yanisch-Perron C., Vierira J. & Messing J.//Gene. 1985. Vol. 33. P. 103.
9. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York, 1989.
10. Antoine R., Loch C.//Mol. Microbiol. 1992. Vol. 6. P. 1785.
11. Gerdes K., Ayora S., Canosa I. et al.//The Horizontal Gene Pool /C.M. Thomas (ed.). Amsterdam, 2000. P. 49.
12. Dennis J.J., Zylstra G.J. //J. Mol. Biol. 2004. Vol. 341. №3. P. 753.
13. Del Solar G., Giraldo R., Ruiz-Echevarria M.J. et al.//Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998. Vol. 62. №2. P. 434.

Поступила в редакцию 10.12.2004.

Марина Алексеевна Титок- кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики.

УДК 581.1

А.И. СОКОЛИК, Н.Ш. МАНГАЛАДЗЕ, Д.А. ОНИАНИ, В.М. ЮРИН, Т.И. ОНИАНИ

МОДИФИЦИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ПОВЫШЕННЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ НЕКОТОРЫХ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ H⁺-АТФазной ПОМПЫ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

It was shown, that elevated microelements concentrations ($2 \cdot 10^{-3}$ M) Fe²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺ inhibit of plant cell plasma membrane H⁺-ATPase activity by action on the inside of membrane.

Микроэлементы представляют собой группу незаменимых питательных веществ растений: многие из них входят в состав активного центра ферментов, обеспечивающих рост и развитие растительных организмов [1], в то же время высокое их содержание в среде произрастания оказывает неблагоприятное воздействие на рост и развитие растений.

Протондвижущая сила, возникающая в результате функционирования H⁺-АТФазной помпы, характеризует энергетическое состояние растительной